

**FLUIDO FOLICULAR NA MANUTENÇÃO DE OVÓCITOS
BOVINOS PARA A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO***

VIOLETA ELOISA LOAYZA VIZCARRA

2000

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FLUIDO FOLICULAR NA MANUTENÇÃO DE OVÓCITOS
BOVINOS PARA A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*

VIOLETA ELOISA LOAYZA VIZCARRA

SOB A ORIENTAÇÃO DO PESQUISADOR

Dr. WANDERLEI FERREIRA DE SÁ

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Magister Scientiae em Medicina
Veterinária, Área de Concentração:
Patologia Animal e da Reprodução.

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO.
DEZEMBRO, 2000.

TÍTULO DATESE

**FLUIDO FOLICULAR NA MANUTENÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS PARA A
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO***

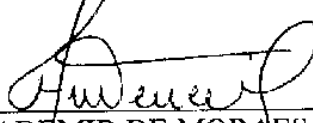
AUTORA:

VIOLETA ELOISA LOAYZA VIZCARRA

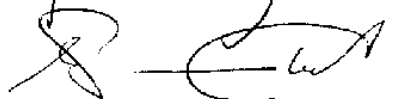
APROVADA EM: 14/12/2000



Professor: Dr. WANDERLEI FERREIRA DE SÁ



Professor: Dr. ADEMIR DE MORAES FERREIRA



Professor: Dr. EDUARDO PAULINO DA COSTA

Dedico este trabalho

A minha Avó MARIA “*in memoriam*”, pelo seu exemplo e carinho a mim dispensado.

Aos meus pais ADOLFO e CECILIA, que sempre me apoiaram e escutaram-me como ninguém o fez, sem eles e seu amor eu não teria conseguido seguir adiante, pois nos momentos que mais precisei, eles estavam junto a mim. Obrigada, pela minha existência e formação.

A meu irmão ALEXANDER, por seu encorajamento, apoio, compreensão e pela alegria que compartilha comigo.

A meus tios JOSÉ e RUBÍ, pelo seu constante apoio e sugestões.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a DEUS por sua condução e inspiração, por me fornecer saúde, força de vontade e perseverança para levar ao término a tese, e pelas lições dia a dia.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Dr. WANDERLEI FERREIRA DE SÁ, pela orientação, e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. LUIZ SÉRGIO DE ALMEIDA CAMARGO, pela paciência, amizade, apoio, e valiosas sugestões durante todas as fases desta tese.

Aos professores ADEMIR DE MORAES FERREIRA e EDUARDO PAULINO DA COSTA, membros da Comissão de Orientação, pelas sugestões de grande valor.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial à coordenadoria do curso, na pessoa da professora Dra. MARIA DA CONCEIÇÃO ESTELLITA VIANNI,

pela oportunidade e incentivo e a OTACILHO JOSÉ DOMINGOS pela sua ajuda constante.

Aos colegas de Curso, pelo companheirismo, sugestões e ajuda desinteressada durante a realização de nossos estudos.

À Empresa Brasileira da Pesquisa Agropecuária, Gado de Leite (EMBRAPA-Gado de Leite).

Ao DR MANOEL CARLOS COUTO de ARAUJO, pelo estímulo, incentivo e colaboração constante para a conclusão deste trabalho em especial por sua amizade.

Ao estagiário do laboratório MENDEL PARADELA BUTILHEIRO, na área de informática, pela sua ajuda e sua amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Reprodução Animal ADIRSON POLICARPO, MYRO RODRIGUES, pelo apoio, cooperação e sobre tudo pela sua amizade.

Aos funcionários da Biblioteca Professor Abílio Nogueira (Embrapa-CNPGL), pela sua colaboração e atenção.

À minha amiga ALEXSANDRA VALÉRIA SOUSA COSTA, pela sua alegria, amizade, compreensão, companheirismo e ajuda em todos os momentos convívios.

Às colegas e amigas do alojamento MARIA ANTONIETA ALFARO VILLATORO, SANDRA BORGES DA SILVA, ELZA MIKA SUZUKI, EVA APARECIDA DE SOUZA, ANDRÉA CECCHETTO BAMBOZZI, LUCIANA ALMADA THOMAZ, VALERIA RÉGIA FRANCO SOUSA pela sua amizade, alegria, apoio e companheirismo.

À Senhora CÉLIA MARIA ELISEI DE OLIVEIRA e a seus filhos CARINA E THIAGO por sua ajuda incondicional, pela sua compreensão, por ouvir-me e pelo seu carinho.

Às demais companheiras do alojamento que durante quase dois anos de convivência me tem oferecido sua amizade, ajuda e respeito.

OBRIGADA POR TUDO O QUE APRENDI COM VOCÊS.

BIOGRAFIA

VIOLETA ELOISA LOAYZA VIZCARRA. filha de Adolfo Heráclides Loayza Cornejo e Cecília Eloiza Vizcarra Llamosas, nasceu em 22 de Janeiro de 1973, na cidade de Arequipa - PERÚ.

Realizou o primeiro e segundo grau no Colégio Particular Chavez da Rosa na Cidade de Arequipa - PERÚ.

Ingressou no Curso de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Católica Santa Maria, em 1991, graduando-se em outubro de 1997.

Estagiou da Estação Experimental Santa Rita Arequipa-PERÚ, de dezembro de 1995 a março de 1996, exercendo atividades de pesquisa nas áreas de bovinotecnia e avicultura. Realizou atividades na Clínica de Pequenos Animais, na Clínica Santa Maria da Universidade Católica Santa Maria.

Desenvolveu atividades em saúde pública estagiou no Município da Província de Puno-PERÚ, de Janeiro a Fevereiro de 1997; no Ministério de Agricultura (Instituto de pesquisa Agrária na Estação experimental ILLPA-PUNO-PERU) de fevereiro a março de 1997 efetuando pesquisas em camelidos sudamericanos.

De maio de 1998 a abril de 1999 foi contratada, prestando serviço rural e urbano marginal de Saúde no Ministério de Saúde.

Em 1999 iniciou o Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, na área de Concentração de Patologia Animal e da Reprodução, na Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, ao nível de Mestrado.

SUMARIO

Páginas

ÍNDICE DE TABELAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. MATURAÇÃO DO OVÓCITO	4
2.2. CONDIÇÕES QUE INTERFEREM COM O MIV/PIV.....	6
2.3. FATORES QUE PARTICIPAM NA MANUTENÇÃO DOS OVÓCITOS.....	9
2.4. FLUIDO FOLICULAR.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. LOCAL DO EXPERIMENTO	15
3.2. OBTENÇÃO DOS OVÁRIOS.....	15

3.2.1	<i>Obtenção, Inativação e Estocagem do Fluido Folicular Bovino (FFb)</i>	16
3.3.	OBTENÇÃO DOS OVÓCITOS.....	16
3.4.	MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	17
3.5.	PREPARAÇÃO DO SÊMEN PARA A FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	18
3.6.	FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	18
3.7.	CULTIVO <i>IN VITRO</i>	19
3.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.	CONCLUSÕES	31
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

ÍNDICE DE TABELAS

Páginas

TABELA 1 : EFEITO DO FLUIDO FOLICULAR BOVINO (FFB) E TALP-HEPES NA MANUTENÇÃO DO OVÓCITO BOVINO IMATURO AVALIADO PELA TAXA DE CLIVAGEM, PRODUÇÃO DE BLASTOCISTOS NO 7 ^o DIA APÓS FECUNDAÇÃO E PRODUÇÃO TOTAL DE BLASTOCISTOS.	28
TABELA 2 : EFEITO DO FLUIDO FOLICULAR BOVINO (FFB) E TALP-HEPES NA MANUTENÇÃO DE OVÓCITO BOVINO IMATURO AVALIADO PELA TAXA DE ECLOSÃO DOS BLASTOCISTOS.	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Páginas

FIGURA 1: SELEÇÃO DE OVÓCITOS: A. OVÓCITO COM CÚMULOS COMPACTO, B. OVÓCITO SEMIDESNUDO, C. OVÓCITO COM CÉLULAS DO CÚMULOS SEMI-EXPANDIDO	20
FIGURA 2: DIVISÃO CELULAR DOS ZIGOTOS BOVINOS APÓS 72 HORAS DA FIV	29
FIGURA 3: BLASTOCISTO EM ECLOSÃO	29
FIGURA 4: BLASTOCISTO ECLODIDO.....	30

RESUMO

O fluido folicular bovino (FFb) provavelmente possui ação inibitória sobre o reinício da meiose. A manutenção de ovócitos imaturos em FFb pode ser uma alternativa para o transporte dessas estruturas após a aspiração folicular. O objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito do FFb sobre a manutenção de ovócitos imaturos recém aspirados de bovinos, avaliando as taxas de clivagem, de blastocistos e de eclosão dos blastocistos. O FFb foi obtido de folículos de 2 a 6 mm. Os ovócitos aspirados foram divididos aleatoriamente em: (T1) Talp Hepes e 70% de FFb, (T2) 100 % de FFb, (T3) 100 % de Talp Hepes, (T4) ovócitos maturados *in vitro* (MIV) logo após a aspiração por 24 horas e fecundados por 22 horas (FIV), representando o grupo controle. Após a fecundação os embriões foram cultivados em CR2. A taxa de clivagem foi avaliada com 72 horas, a taxa de blastocistos no 7^o dia após fecundação (dpf) e a taxa de blastocistos eclodidos no 10^o e

11^o dpf. Os resultados foram analisados pelo Qui-quadrado. A taxa de clivagem, de blastocistos e de blastocistos eclodidos foram semelhantes ($p>0,05$) entre os tratamentos. A proporção de blastocistos no 7^o dpf foi maior ($p<0,05$) para o grupo controle. Os resultados demonstram que após aspiração dos ovócitos, mantidos no FFb, quando aquecido a 37^oC, durante 5 horas causa um pequeno atraso no desenvolvimento embrionário, observado pela menor taxa de blastocistos no 7^o dia após fecundação. Entretanto, este atraso não foi observado no 8^odpf, sendo o FFb indicado como meio de transporte desses ovócitos até o laboratório no período de tempo citado.

SUMARY

The bovine follicular fluid (bff) probably has an action inhibitory on the restart of the meiosis. The maintenance of immature oocytes in bff can be an alternative for the transport of those structures after the follicular aspiration. The objective of this work was evaluate the effect of the bff on the maintenance of recently aspired immature oocytes of bovine. The bff was obtained of follicles with diameter among 2 to 6 mm. Oocytes were randomly divided in four treatments: (T1) 70% of bff in Talp Hepes, (T2) 100% of bff, (T3) 100% of Talp Hepes and (T4) the oocytes were in vitro maturation immediately after the aspiration. In vitro maturation was done for 24 hours and in vitro fertilization for 22 hours, that represented the control group. After the fertilization, the embryo was cultured in CR2. The cleavage rate was evaluated in 72 hours, the blastocyst rate in the 7th and 8th day and the hatched blastocyst rate in the 10th and 11st day after the fertilization. The results were

analysed by Chi-square. The cleavage, blastocyst and hatched blastocyst rate were similar ($p>0,05$) to the treatments. However, the blastocyst proportion in the 7th day after fertilization was larger ($p<0,05$) in the control group. The results demonstrate that bff can maintain bovine oocytes, for 5 hours after the aspiration, can cause a small delay in the embryonic development, observed by the lowest blastocyst rate in the 7th day, however it was not observed in the 8th day after fertilization. However, the bff can be indicated as transportation medium of the oocytes to the laboratory in the period of time mentioned.

1. INTRODUÇÃO

O emprego de biotecnologia, como a produção *in vitro* de embriões, representa um grande potencial para a otimização de resultados na reprodução animal. Esta biotécnica possibilita o aproveitamento de um maior número de ovócitos, e com isso oferece melhores perspectivas para a produção de embriões em larga escala. Entretanto, a taxa de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* após a maturação *in vitro* (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV), é menor do que a verificada *in vivo* (HYTTEL *et al.* 1997). Um dos fatores que contribui para isso é o comprometimento do potencial de desenvolvimento do ovócito. Corroborando com esta afirmação, MOTLIK & FULKA (1986) observaram que os ovócitos de bovino vão gradualmente adquirindo condições necessárias para o desenvolvimento do conceito.

Os sistemas de maturação *in vitro*, ainda não permitem que os eventos fisiológicos nucleares aconteçam em forma sincronizada com os citoplasmáticos, quando comparados à

maturação *in vivo*, sendo possivelmente uma das razões pela baixa qualidade de embriões procedentes da MIV e FIV (MOOR & WARNES, 1979a).

São fundamentais as pesquisas sobre essa biotecnologia, principalmente em sistemas de manutenção de ovócitos, pois a viabilidade destes é essencial para o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

O fato da maturação do ovócito inicia-se logo após a sua remoção do interior do folículo, pode comprometer a capacidade de desenvolvimento do embrião, principalmente quando se realiza coleta de ovócito *in vivo*, verificando-se alterações na fecundação, distribuição de grânulos corticais e formação de pronúcleo, quando se compara a maturação *in vitro* com *in vivo* (IRITANI *et al.* 1984; HYTTEL *et al.* 1989; MARQUANT-LE *et al.* 1989). Sendo assim, há necessidade de se desenvolver meios que mantenham o ovócito viável durante o seu transporte até o laboratório, mantendo sua capacidade de completar a maturação nuclear e citoplasmática.

A inibição do reinício da meiose, imediatamente após a aspiração folicular e durante o período de transporte, é considerado por alguns autores como uma maneira de manter a viabilidade do ovócito para a produção *in vitro* (PIV) (CHANG, 1955). Para isto, têm sido realizados estudos utilizando princípios fisiológicos e farmacológicos. Apesar da maioria destes princípios não serem compatíveis com a sobrevivência do ovócito, verificou-se que o fluido folicular inibe a maturação desta estrutura sem comprometer o seu potencial de desenvolvimento (SIRARD, 1989-1990; AYOUB & HUNTER, 1993; DOSTAL & PAVLOK, 1996). Segundo estes autores, este fluido fisiológico representa um meio provável para a manutenção e transporte dos ovócitos.

O objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito do fluido folicular na manutenção de ovócitos imaturos recém aspirados, mantendo o desenvolvimento do ovócito até blastocisto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MATURAÇÃO DO OVÓCITO

Embora os eventos fisiológicos capazes de induzir as transformações morfológicas e metabólicas que ocorrem na maturação dos ovócitos, não estejam ainda totalmente esclarecidos, observa-se que durante esta fase ocorre uma gradual capacitação do ovócito para o futuro desenvolvimento embrionário (MOTLIK & FULKA, 1986).

A maturação dos ovócitos pode ser definida como o somatório de eventos fisiológicos que tornam este gameta apto a ser fertilizado e iniciar o desenvolvimento embrionário (GRIMES & IRELAND, 1986; LEIBFRIED-RUTLEDGE *et al.* 1987). Corroborando, ASSEY *et al.* (1994) observaram que ovócitos bovinos aspirados de folículos dominantes, antes da onda pré-ovulatória de LH, sofrem alterações na morfologia nuclear e

citoplasmática, essenciais para o seu desenvolvimento. Segundo BEVERS *et al.* (1997) e HYTTEL *et al.* (1997), durante o processo de maturação nuclear e citoplasmática, que acontecem no período de desenvolvimento pré-ovulatório do ovócito, há alterações no número, tamanho e também na posição das organelas citoplasmáticas, que vão em direção ao centro da célula, formando assim, o córtex livre. HYTTEL *et al.* (1986-1989) observaram que ovócitos imaturos apresentam um espaço perivitelino, membranas vesiculosas distribuídas uniformemente, grupos de mitocôndrias na periferia, formação do primeiro corpúsculo polar, e como últimas alterações, prolongamentos citoplasmáticos das células do cúmulo penetrando a zona pelúcida, além da dispersão dos grânulos corticais ao longo da periferia do citoplasma. Estes autores ressaltam que a dispersão dos grânulos é uma alternativa para a avaliação ultraestrutural da maturação final de ovócitos. Nestes trabalhos também se constatou que ocorre um aumento no número de grânulos corticais, simultaneamente com o decréscimo dos complexos de Golgi e agrupamento do REL. (Retículo endoplasmático liso), demonstrando uma possível redução no metabolismo do oócito. MOOR & WARNES (1979a); BEVERS *et al.* (1997) e HYTTEL *et al.* (1997) consideram que estas mudanças são de extrema importância para a fertilização e posterior desenvolvimento do conceito.

A maturação nuclear e citoplasmática inicia-se em quase todos os mamíferos após o nascimento, no momento em que a ovogonia deixa de proliferar e os cromossomos passam à primeira divisão meiótica, até a fase de dictióteno (SÜSS & WÜTHRICH, 1985). Conforme estes autores, nesta fase as células germinais, ou ovócitos, têm um núcleo grande denominado vesícula germinal (VG) que apresenta a cromatina descondensada.

Em cada ciclo ovariano da vida reprodutiva dos mamíferos, um número limitado de ovócitos retoma a divisão meiótica (AKTAS *et al.* 1995), há dissolução do envelope nuclear ou ruptura da vesícula germinal (RVG) e o condensamento da cromatina, formando-se o primeiro corpo polar (WASSARMAN, 1988). Estas ocorrências caracterizam a metáfase da segunda divisão meiótica, onde ocorre uma nova interrupção da meiose que só será reiniciada após a ativação pelo espermatozóide (SIRARD *et al.* 1989).

WASSARMAN (1988) afirma que na maturação do ovócito há uma etapa denominada “aquisição de competência meiótica”, a qual confere a esta célula germinativa a capacidade de sofrer redução meiótica. A aquisição de competência meiótica ocorre em duas etapas, sendo que na primeira o ovócito torna-se capaz de quebrar a vesícula germinal e atingir a metáfase I (M I), e na segunda o ovócito adquire a capacidade de desenvolvimento até a metáfase II (M II). Durante estas etapas a maturação nuclear é regulada pela ação do “fator promotor de maturação citoplasmático”, o qual ativa a quebra da VG e promove a condensação cromossômica (NORBURY & NURSE, 1992). Também o FSH promove a condensação cromossômica e a formação dos pronúcleos, juntamente com a emissão do primeiro corpo polar, tendo seu efeito mediado pela ação do estrógeno (WASSARMAN, 1988).

2.2. CONDIÇÕES QUE INTERFEREM COM O MIV/PIV

Apesar da produção *in vitro* (PIV) ser uma inovadora biotecnologia, o processo de fertilização dos oócitos e o consequente desenvolvimento embrionário apresentam resultados inferiores aos observados *in vivo* (LIEBFRIED-RUTLEDGE *et al.* 1987).

Segundo (MOOR & WARNES, 1979b e STAIGMILLER & MOOR, 1984) fatores que atuam durante a maturação *in vitro* (MIV) e mesmo na fecundação *in vitro* (FIV), podem estar comprometendo o desenvolvimento destas técnicas. Acredita-se que a maturação citoplasmática incompleta seja um possível fato que interfere nos resultados da PIV, afetando assim a qualidade do potencial do ovócito para o desenvolvimento embrionário (LIEBFRIED - RUTLEDGE *et al.* 1987). Observou-se a ocorrência de atraso na dispersão dos grânulos corticais no citoplasma nos ovócitos maturados *in vitro*, quando comparado com os maturados *in vivo* (HYTTEL *et al.* 1989).

A qualidade do ovócito é indispensável para o sucesso de PIV, com o mesmo devendo apresentar boas características morfológicas e competência de desenvolvimento (LIEBFRIED - RUTLEDGE *et al.* 1987) *in vitro*. MOOR (1978) e CRAN (1989) relatam que ovócitos imaturos e ovócitos velhos têm maior tendência à polispermia, pois no caso dos imaturos os grânulos corticais não estão ainda dispostos na periferia, e em ovócitos velhos há problemas de interação celular devido à maturação exagerada.

Na MIV é comum haver uma fragmentação celular e desenvolvimento embrionário retardado, quando se utiliza ovócitos não totalmente maduros. Existem algumas substâncias que interferem nesta maturação de ovócitos, como o fator promotor da maturação (MPF), que atua no desaparecimento da membrana nuclear e condensação cromossômica (JAIN *et al.* 1976; NORBURY & NURSE, 1992).

Um ovócito considerado maduro a nível nuclear, não significa que esteja pronto para ser fecundado ou de ter um desenvolvimento embrionário normal (COSTA, 1994), devido às grandes diferenças no potencial de desenvolvimento de embriões oriundos de ovócitos maturados *in vitro* quando comparados com os maturados *in vivo*. Durante o processo de

maturação é fundamental que ocorra uma sincronização entre os eventos nucleares, citoplasmáticos e de membrana, para uma normal fecundação e desenvolvimento embrionário (MOOR & WARNES, 1979a e STAIGMILLER & MOOR, 1984). Portanto, é essencial para PIV a completa maturação *in vitro* (MIV) dos ovócitos, o que lhes irá conferir melhores condições para o desenvolvimento embrionário (BRACKETT, 1983; BEVERS *et al.* 1997; HYTTTEL *et al.* 1997).

Sendo os eventos fisiológicos intracelulares que atuam no desenvolvimento embrionário, associados com a aquisição da competência meiótica adquirida durante a maturação do ovócito (COSTA, 1994). Segundo MOORE & LINTERN-MOORE (1974) o citoplasma de ovócitos de mamíferos pré-púberes não sintetizam o MPF e outras proteínas indispensáveis para o reinício da meiose.

Alguns autores afirmam que o tamanho do folículo possui uma correlação com a competência meiótica (TSAFRIRI & CHAINNING, 1975b; SORENSEN & WASSARMAN, 1976). Segundo eles, em ovócitos aspirados de folículos pequenos não há conclusão da meiose. Da mesma forma, MOTLIK & FULKA (1986) verificaram que ovócitos obtidos de pequenos folículos antrais têm uma habilidade limitada para retomar a meiose após 24 horas de cultivo.

Avaliando o tempo de maturação SÜSS & WÜTHRICH (1985); SIRARD *et al.* (1989); SIRARD & BILODEAU (1990) e FUKUDA *et al.* (1990) encontraram melhores respostas após 24 horas de cultivo. Corroborando com estes autores, MONOGHAN *et al.* (1993) testaram o efeito de 18 e 24 horas de cultivo sobre a maturação de ovócitos, observando respectivamente, 81 e 80% de maturação nuclear e 74 e 76% de clivagem.

Entretanto estes autores verificaram maior taxa de blastocistos com a maturação por 24 horas.

Talvez seja necessário que os ovócitos obtidos de folículos menores, sejam submetidos a um tratamento após a aspiração, para que adquiram condições fundamentais para desenvolvimento embrionário, pois a aspiração folicular pode interromper a maturação (LONERGAR *et al.* 1997).

Segundo SIRARD *et al.* (1995) durante a MIV, a origem do fluido folicular influi na habilidade dos ovócitos de adquirir competência para o desenvolvimento embrionário. Ao realizar estudos avaliando a correlação entre o diâmetro do ovócito bovino, o tamanho folicular, a competência meiótica e a síntese de RNA, FAIR *et al.* (1995) encontraram uma pequena correlação positiva entre o diâmetro do ovócito e o tamanho folicular, observando que ovócitos de diâmetro menores de 2 mm possuíam menor capacidade de obter maturação que os de maior diâmetro (3 a 4 mm), e uma diminuição gradual na síntese de RNA com aumento do diâmetro dos ovócitos.

2.3. FATORES QUE PARTICIPAM NA MANUTENÇÃO DOS OVÓCITOS

Muitos sistemas de maturação têm sido testados procurando um efeito estimulador da maturação. Alguns autores adicionaram hormônios e soros aos meios de cultivo, com o objetivo de alcançar melhores taxas de maturação e, por conseguinte, maior produção de blastocistos (LIEHMAN *et al.* 1986; SIRARD & FIRST, 1988). RACOWSKY & McGAUGHEY (1982) consideram que os estrógenos e progesterona são esteróides intimamente envolvidos na maturação citoplasmática e nuclear dos ovócitos. BEVERS *et*

et al. (1997) isolaram do fluido folicular humano um esteróide que ativa a meiose; sendo assim as concentrações destes hormônios e gonadotropinas no plasma periférico e fluido folicular são importantes para o processo de maturação do ovócito, atuando especificamente na meiose, inibindo ou estimulando-a, refletindo assim na fertilização e desenvolvimento embrionário.

Os protocolos atuais de MIV utilizam tanto o LH, como o FSH ou mesmo a combinação destes (FLEMING & WATOM, 1993). LIEBFRIED & FIRST (1980) afirmam que estes hormônios gonadotróficos influenciam na divisão do ovócito, acelerando a maturação, o que ocorre através da inibição ou redução da atividade do inibidor da maturação (OMI) e da redução de concentrações de íons nas células da granulosa, propiciando desta forma a retomada da meiose. TSAFRIRI *et al.* (1982), FRETER & SCHULTZ, (1983), para explicarem o mecanismo desbloqueador do LH sobre a maturação, durante o pico ovulatório, prepusaram que esta gonadotropina estimula a degradação das *junções gap*, interrompendo a via de acesso do OMI ao ovócito; bem como o LH inibiria a síntese ou a liberação de OMI pelas células da granulosa; e por fim, acredita-se que o LH poderia agir diretamente sobre o ovócito (TSAFRIRI *et al.* 1982).

O OMI foi caracterizado como peptídeos secretados pelas células da granulosa de baixo peso molecular e sensível ao calor, que passam através das *junções gap* e inibem a divisão celular, mantendo as células germinativas na fase de dictióteno (WASSARMAN, 1988). Entre os mecanismos de ação propostos para o efeito inibidor do OMI, existe a hipótese de que este fator inibiria a atividade transcripcional indispensável para a retomada da meiose (FRANCHIMONT, 1982; SIRARD *et al.* 1992). O FSH e a prolactina

estimulariam a célula da granulosa a secretar o OMI, enquanto que a testosterona e dihidrotestosterona inibiriam sua secreção.

Alguns fatores secretados pelas células da granulosa também interferem com a maturação de ovócitos, ao promoverem aumento na secreção da prolactina, a qual inibe a maturação destes gametas (CHAINNING & EVANS, 1982).

Segundo SUH *et al.* (1993) o co-cultivo com células da granulosa interfere no desenvolvimento embrionário. Corroborando, SAEKI *et al.* (1990) observaram que esse co-cultivo beneficia o processo de MIV e com isso aumenta a taxa de produção de blastocistos, quando comparado com o método convencional de MIV.

Segundo GUERRA & PETERS (1990) as comunicações intercelulares são outros dos fatores que participam do desenvolvimento do ovócito. Através das *junções gap*, que representam locais de continuidade física entre ovócitos, células do *cúmulo oophorus* e as células da granulosa, ocorre a intercomunicação de ovócito e células circunjacentes. WASSARMAN (1988) observou que o AMPc, produzido pelas células foliculares, passa através das *junções gap* e promovem uma inibição da meiose. Pouco antes da ovulação, o número de *junções gap* decresce em cerca de 90%, e esta perda se correlaciona com a ruptura de vesículas germinativas (RVG) e expansão de *cúmulos oophorus*. Assim, acredita-se que por meio de tal mecanismo os fatores que bloqueiam a meiose seriam suprimidos e a célula prosseguiria dividindo-se (GUERRA & PETERS, 1990). Também o cálcio e o magnésio atuam sobre a divisão celular, sendo estes ions importantes por reverterem o bloqueio da meiose (WASSARMAN, 1988). CHAINNING & EVANS (1982) e WASSARMAN (1988) demonstraram que o acréscimo de um inibidor do transporte de

cálcio bloqueia a quebra da membrana nuclear, e que o magnésio é necessário para que a maturação do ovócito se complete.

Outros trabalhos mostram a presença de uma variedade de compostos que atuam na maturação. HUBBARD (1983) observou em ovócitos de hamsters que a guanidina monofosfato cíclica poderia ser responsável pela inibição da maturação. Assim como EUSEBI *et al.* (1983) ao realizarem estudos em humanos, verificaram a ativação da meiose através da participação da acetilcolina na fase final da maturação.

2.4. FLUIDO FOLICULAR

CHANG (1955), TSAFRIRI & CHAINNING (1975b) e EPPIG & DOWNS (1987) verificaram a atividade inibitória do fluido folicular sobre a maturação de ovócitos em vacas, ovelhas, coelhas, hamster e mulheres. DOSTAL & PAVLOK (1996) e BEVERS *et al.* (1997) afirmam que fatores presentes no fluido folicular bloqueiam o reinício da meiose de ovócitos. Segundo estes autores, ovócitos cultivados *in vitro* dentro do ambiente folicular, apresentam uma aparência normal de maturação nuclear, no entanto apenas uma pequena parte desenvolveu-se após a fecundação, o que reafirma a presença de substâncias no fluido folicular que direta ou indiretamente interrompem a maturação meiótica.

Neste exsudado do plasma sangüíneo, que contem glicoproteínas e esteroides, também se observa a presença do fator inibidor da maturação (OMI) (TSAFRIRI & CHAINNING, 1975a). LIEBFRIED-RUTLEDGE *et al.* (1989) consideram que esta substância inicialmente caracterizada como proteína, seja produzida pelas células da granulosa, uma vez que o co-cultivo *in vitro* de ovócitos com um grande número destas

células ou em meios condicionados por estas, inibem a retomada da meiose. Segundo CHAINNING & EVANS (1982) o OMI é secretado em quantidades significativas pelas células da granulosa de folículos pequenos e médios, enquanto que em folículos grandes esta secreção seria insignificante.

CROSS & BRINSTER (1970) observaram que em meios de fertilização com fluido folicular bovino ocorre uma diminuição da fertilidade, podendo reduzir a polispermia. CHOI *et al.* (1998) estudaram o comportamento de ovócitos bovinos maturados em fluido folicular obtidos de folículos grandes (6 mm) e folículos pequenos (2-5 mm), e observaram uma maior capacidade de maturação e maior taxa de blastocistos em ovócitos obtidos nos folículos de menor diâmetro. No entanto, SIRARD & FIRST (1988) não observaram efeito inibitório do fluido folicular sobre ovócitos, quando utilizaram esse meio numa proporção de 50%, levando-os a considerar que o efeito inibitório do fluido folicular sobre a meiose seja dose dependente. BEVERS *et al.* (1997) constataram um efeito inibitório do fluido de folículos em maior e menor grau, sugerindo modificações na composição do fluido folicular com o decorrer do desenvolvimento do folículo, levando à diminuição deste efeito inibitório.

Alguns autores observaram que outros componentes do fluido folicular bovino têm efeito parcial sobre a maturação de ovócitos (TSAFRIRI & CHANNING, 1975a). Entre estes componentes relatam o efeito inibitório do ácido linoléico e da hipoxantina sobre a meiose de ovócitos desnudos de bovinos. Estes autores observaram que no fluido folicular, além dos fatores que inibem a maturação, existem alguns fatores que atuam positivamente na retomada da maturação dos ovócitos. KA *et al.* (1997) e CHOI *et al.* (1998) afirmam que o fluido folicular contém diversos tipos de hormônios, tais como esteróides sexuais,

prostaglandinas, peptídeos, relaxina, gonadotropinas e estradiol, tanto como diversos fatores de crescimento, que estimulam a maturação nuclear e citoplasmática. YOSHIDA *et al.* (1992) e KIM *et al.* (1996) mostraram que no fluido folicular bovino e porcino variam os níveis de um inibidor e de um estimulador da meiose, de acordo com o estágio de desenvolvimento dos folículos. O fluido folicular coletado de 0 a 4 horas após a onda de LH possui atividade na inibição da meiose, o qual está ausente no fluido folicular coletado 8 ou mais horas após a onda de LH (ROMERO-ARREDONDO & SEIDEL, 1994).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LOCAL DO EXPERIMENTO

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, no período de janeiro a agosto do ano 2000.

3.2. OBTENÇÃO DOS OVÁRIOS

Os ovários foram coletados de vacas abatidas no matadouro da cidade de Juiz de Fora – MG. Imediatamente após o abate, os ovários foram removidos, independentemente da fase do ciclo estral em que se encontravam, procurando ainda evitar a contaminação com resíduos orgânicos. Os ovários foram transportados para o laboratório em solução fisiológica 0,9% de NaCl, acrescida de 0,05g/L de sulfato de estreptomicina, a uma temperatura de 34 a 35°C.

No laboratório, os ovários foram lavados com a mesma solução de transporte, depositados num Becker e mantidos em banho-maria a 37°C, para posterior aspiração dos folículos.

3.2.1 Obtenção, Inativação e Estocagem do Fluido Folicular Bovino (FFb)

O fluido folicular foi obtido por aspiração de folículos de 2 a 6 mm de diâmetro, com uma seringa de 10 ml e agulhas 25x8 mm. Após a aspiração, o líquido folicular foi centrifugado duas vezes por um tempo de 15 minutos a 300 x g. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e inativado a 56°C por 30 minutos, sendo filtrado, aliquoteado, congelado a -15°C e descongelado por ocasião do uso. Foram utilizadas três partidas de FFb inativado, e em todas a osmolaridade foi mensurada

3.3. OBTENÇÃO DOS OVÓCITOS

Os ovócitos foram obtidos pela aspiração de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro, de ovários de matadouro (semelhante ao item 3.2), sendo o conteúdo depositado em cálice cônico contendo 5 ml Talp-Hepes mantido a 37°C em banho-maria. Após 15 minutos de decantação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido com 10 ml de Talp-Hepes, transferido para uma placa de Pétri, e mantido numa mesa aquecedora a 37°C, onde os ovócitos foram selecionados e classificados com auxílio de um microscópio estereoscópio. Considerou-se viáveis, os ovócitos com células do *cúmulus oophorus* compacto, possuindo no mínimo três camadas de células, citoplasma homogêneo e sem alterações visíveis. (FIGURA 1)

Após a seleção, lavagem e contagem, os ovócitos foram distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos:

- Tratamento 1 (T1): Os ovócitos foram mantidos em meio constituído de 70% de FFb e 30% de Talp-Hepes.
- Tratamento 2 (T2): Os ovócitos foram mantidos em meio constituído de 100% de FFb.
- Tratamento 3 (T3): Os ovócitos foram mantidos em meio constituído de 100% de Talp-Hepes.
- Tratamento 4 (Controle): Os ovócitos foram levados para a maturação *in vitro*, logo após a aspiração folicular e seleção.

Nos tratamentos T1, T2 e T3, os ovócitos permaneceram em 1,2 ml dos meios durante 5 horas a 37°C, em tubos de Eppendorf vedados com parafilme.

3.4. MATURAÇÃO *IN VITRO*

Na maturação, os ovócitos foram colocados em placas de Petri escavadas, contendo 400 µl de TCM-199, acrescidos de 10% de soro de vaca em cio (SVC) e 20 µg/ml de FSH conforme COSTA (1994), e levados para estufa incubadora a uma temperatura de 38,6°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ em ar atmosférico, por 24 horas.

3.5. PREPARAÇÃO DO SÊMEN PARA A FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

Para cada repetição utilizou-se uma palheta de sêmen congelado de bovino da raça Holandesa. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 30 segundos e avaliado em sua motilidade e vigor, conforme FONSECA *et al.* (1992).

Os espermatozóides foram obtidos através da técnica do “swip-up”, (PARRISH *et al.* 1995) da seguinte maneira:

O conteúdo de cada palheta foi dividido e depositado no fundo de dois tubos com tampa, contendo 1 ml do meio SPTL adicionado de 20µg/ml de heparina. Em seguida os tubos contendo o sêmen e o SPTL foram levados para estufa incubadora e mantidos a 39°C e 5% de CO₂, durante uma hora. Após a incubação, o sobrenadante contendo os espermatozóides foi recuperado e centrifugado por 8 minutos a 200 x g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado com 1 ml de SPTL, adicionado de 200 µg /ml de heparina e levado para estufa incubadora por mais 15 minutos, sob as mesmas condições atmosféricas citadas anteriormente. Durante este período foi realizada a contagem espermática em câmara Neubauer e avaliada a motilidade e o vigor. Ao final dos 15 minutos, o conteúdo foi novamente centrifugado durante 8 minutos a 200 x g e o sedimento ressuspensionado em 0,5 ml de meio de Fert-Talp, antes de seguirem para a FIV.

3.6. FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

A fecundação *in vitro* foi realizada em gotas de 100-150 µl de meio Fert-Talp, acrescido de 2,0 a 2,5 x10⁶ de espermatozóides/ml e 30-40 ovócitos, cobertas com óleo

mineral, e mantidas em estufa incubadora com 5% CO₂, em ar atmosférico e 95% de umidade a 38,6 °C, durante 22 horas.

3.7. CULTIVO *IN VITRO*

Após a fecundação, os ovócitos foram parcialmente desnudados e lavados por duas vezes em meio Talp-Hepes e uma vez em meio de CR2 aa. (WANG *et al.*, 1997).

O cultivo foi realizado em gotas de 50 µl de meio CR2aa acrescentado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 mM de glicina e 1,0 mM de alanina, cobertas por óleo mineral e posteriormente levado a uma estufa incubadora com 5% CO₂, em ar atmosférico e 95% de umidade com uma temperatura de 38,6 °C, durante 10 a 11 dias. Metade do meio de cultivo foi trocado entre 72 e 96 horas após o início da fecundação, sendo avaliada a taxa de clivagem às 72 horas após fecundação, a taxa de produção de blastocistos no sétimo e oitavo dia de cultivo e a taxa de blastocistos eclodidos foi avaliado no 10 e 11 dia.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros avaliados foram taxa de clivagem, taxa de blastocisto total, taxa de blastocisto no sétimo e oitavo dia, e taxa de blastocistos eclodidos com relação ao total de blastocistos. Os resultados foram analisados através do teste de Qui-Quadrado, com exceção da taxa de blastocistos eclodidos, no qual foi utilizado o Teste Exato de Fisher.

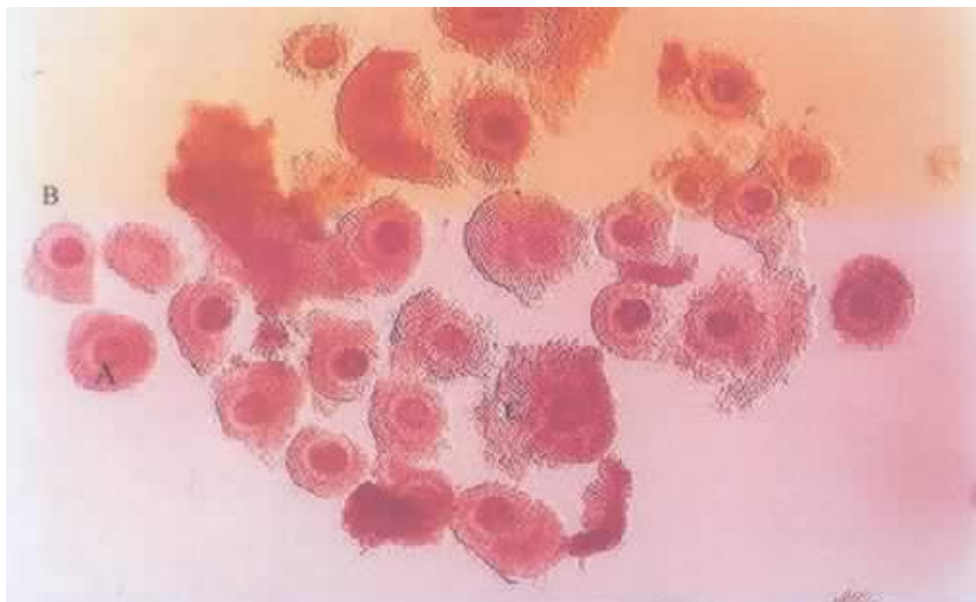


FIGURA 1: SELEÇÃO DE OVÓCITOS: A. OVÓCITO COM CÚMULOS COMPACTO, B. OVÓCITO SEMIDESNUDO, C. OVÓCITO COM CÉLULAS DO CÚMULOS SEMI-EXPANDIDO.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente experimento, os ovócitos mantidos em 70% e 100% de fluido folicular bovino e em 100% de Talp-Hepes por 5 h após a aspiração folicular, apresentaram taxa de clivagem (FIGURA 2), taxa de blastocisto total e blastocistos eclodidos (FIGURA 3 e 4) semelhantes ($p>0,05$) ao grupo controle, (TABELA 1 e 2). No entanto, a taxa de blastocistos encontrada no 7º dia pós-fecundação (FIGURA 3) foi maior ($p<0,05$) no grupo controle, quando comparado com os tratamentos com 70% e 100% de FFb. (TABELA 1).

Os resultados de taxa de blastocistos total e blastocistos eclodidos encontrados neste experimento mostram a capacidade do FFb em manter o potencial de desenvolvimento dos ovócitos, quando estes são mantidos por 5 horas a 37°C em ar atmosférico. O mecanismo pelo qual o FFb manteve o potencial de desenvolvimento dos ovócitos pode ter sido através de sua ação inibitória sobre a meiose. Recentemente, BEHRENSDORF (1999) encontrou

ao final de um período de seis horas, no qual os ovócitos bovinos foram condicionados em 100% de FFb, uma maior taxa de ovócitos que se mantiveram em estágio de ruptura de vesícula germinativa (RVG), com menor porcentagem de ovócitos apresentando condensação cromossômica I e condensação cromossômica II, o que representaria um atraso no reinício da meiose por ação do FFb. Esta maior taxa de ovócitos em RVG também foi encontrado por AYOUB & HUNTER (1993); BEVERS *et al.* (1997) e SIRARD & FIRST (1988), que consideraram uma evidência da ação inibitória do FFb sobre o desenvolvimento do ovócito.

O efeito inibitório do FFb varia em função da concentração (LARROCA *et al.* 1995 e CHOI *et al.* 1998). No experimento realizado por KIM *et al.* (1996) verificou-se que a utilização de 60% de FFb obtidos de folículos de 1-5mm no meio de maturação inibem o desenvolvimento e a maturação do ovócito, o que deve ser em função da coagulação das células da massa do cúmulo causada pelo fibrina livre presente no fluido. Ao passo que o FFb na concentração de 10% estimulou a maturação, bem como a habilidade para o desenvolvimento de células germinativas bovinas. Portanto, a manutenção da viabilidade dos ovócitos que permaneceram em 70 ou 100% de FFb pode ter sido através de sua ação inibitória sobre a meiose, mantendo-a nos estágios iniciais, evitando que os ovócitos viessem a atingir metáfase II antes do final das 24 h de cultivo utilizado para a maturação *in vitro*.

O tempo ideal de maturação *in vitro* está em torno de 18 a 24 h (MONOGHAN *et al.* 1993). Ao se avaliar o tempo de maturação *in vitro*, SÜSS & WÜTHRICH (1985); SIRARD *et al.* (1989); SIRARD & BILODEAU (1990) e FUKUDA *et al.* (1990) encontraram melhores respostas após 24 horas de cultivo. Corroborando com estes autores,

MONOGHAN *et al.* (1993) testaram o efeito da maturação de ovócitos cultivados por 18 e 24 horas, observando 81 e 80% de maturação nuclear, 74 e 76% de clivagem, respectivamente, enquanto a maior taxa de blastocistos ocorreu com período de maturação por 24 horas. Entretanto, tempo maior do que 24 h de maturação podem ser prejudiciais ao desenvolvimento posterior dos ovócitos fecundados, produzindo piores taxas de produção de embriões (BRACKETT, 1983; BEVERS, *et al.* 1997 e HYTTEL *et al.*, 1997) e maiores taxas de polispermia e ativação partenogenética (CRAN, 1989; BRACKETT, 1983 e KING, *et al.* 1986), resultado de ovócitos que atingiram metáfase II durante as 24 h necessárias para a maturação, e que com o decorrer do tempo vão se tornando susceptíveis as alterações de fertilização ou a partenogênese.

É provável que a inibição da retomada da meiose, durante o período de 5 h dos ovócitos em FFb, tenha contribuído para que o tempo de 24 h de maturação *in vitro* fosse adequado para a maturação nuclear, de modo que essa somente se reiniciasse totalmente quando os ovócitos fossem transferidos para o meio de maturação apropriado, mantendo o potencial de desenvolvimento do ovócito, resultando em uma taxa de blastocistos total semelhante ao controle,

O papel do FFb sobre a maturação ovocitária pode ser mediada por gonadotrofinas e outros hormônios (prolactinas), bem como por AMPc, substâncias importantes para o processo de maturação do ovócito, através de seus efeitos inibidores ou estimuladores da meiose, e refletem na fertilização e desenvolvimento embrionário (FLEMING & WATOM, 1993). Sendo assim, o efeito inibitório do FFb pode ocorrer por intermédio da ação destes fatores inibidores ou estimuladores como gonadotrofinas, hormônios (FSH e prolactinas) e AMPc. Estes compostos atuam estimulando as células da granulosa a secretar o OMI, que

por intermédio das *junções gap* atua no ovócito mantendo-o na fase de dictióteno (WASSARMAN, 1988).

O tamanho do folículo parece influenciar o efeito do FFb sobre a inibição da retomada da meiose. KIM *et al.* (1996) observaram que o fluido folicular obtido de pequenos folículos (2-6 mm) diminui a capacidade de desenvolvimento do oócito quando na maturação *in vitro*. Também BEVERS *et al.* (1997) verificaram um maior efeito inibitório de FFb oriundo de folículos menores (1-5 mm), sugerindo que as alterações ocorridas na composição do FFb com o decorrer do desenvolvimento folicular levam a uma diminuição deste efeito inibitório sobre o desenvolvimento do ovócito e o surgimento de um estímulo à maturação. Portanto, a utilização de FFb aspirado de folículos menores do que 6 mm de diâmetro, como o utilizado no presente experimento, resulta em maior eficiência na inibição da retomada da meiose.

No presente experimento também se observou resultados semelhantes, quando os ovócitos foram mantidos pelo mesmo período em um meio que não inibe a retomada da meiose (Talp-Hepes). Os ovócitos quando retirados do ambiente folicular perdem o contato com os agentes inibidores presentes no FFb, e reiniciam a meiose, iniciando o processo de maturação (DOSTAL & PAVLOK, 1996; BEVERS *et al.* 1997). No entanto, para que a maturação ocorra de maneira eficiente, é necessária a presença de hormônios, como o FSH e LH, que ativam o fator de promoção da meiose (MPF) (TSAFRIRI & CHANNING, 1975b). Como o meio Talp-Hepes não possui agentes inibidores e nem hormônios estimuladores da meiose (BEHRENSDORF, 1999) a meiose provavelmente foi retomada, porém, com progressão mais lenta, mas suficiente para manter a viabilidade do ovócito.

Apesar das taxas de blastocistos total e de blastocistos eclodidos (TABELA 1 e 2) terem sido semelhantes entre os tratamentos e controle, a taxa de blastocistos no 7º dia pós-fecundação foi maior para o controle (34,8%) do que para os tratamentos com 70% (21,1%) e 100% (18,5%) de FFb, e semelhante ao tratamento com Talp-Hepes (25,2%) (TABELA 1). Esses resultados mostram que embora a manutenção de ovócitos bovinos em FFb não interferiu na produção de blastocistos, existe um atraso no desenvolvimento desses zigotos, quando comparado com o grupo controle, e que reflete na porcentagem de blastocistos recuperados no sétimo dia de cultivo após a fecundação.

O resultado inferior quanto à taxa de blastocistos no sétimo dia, obtido pelos tratamentos contendo FFb, pode ter sido provocado por uma maturação citoplasmática alterada do ovócito, tendo efeito posterior na fecundação, atrasando o desenvolvimento embrionário. Os efeitos do FFb sobre a maturação nuclear são bem conhecidos (TSAFRIRI & CHANNING, 1975b) porém, pouco se sabe sobre a maturação citoplasmática.

Isto pode significar que as concentrações de FFb utilizadas no presente trabalho são suficientes para inibir a meiose durante o tempo testado, contudo, pode não ser suficiente para obter maturação citoplasmática completa, resultando no atraso do desenvolvimento do embrião no 7 dpf, sem reflexo na taxa de clivagem e taxa de blastocisto total. Apesar deste atraso do desenvolvimento de ovócitos no 7 dpf, este pode ser utilizado como opção quando as condições não permitirem o uso de outros meios de cultivo, pois a taxa de clivagem e blastocisto total não apresentaram diferenças estatísticas ao se comparar estas taxas com o controle.

Segundo LARROCA *et al.* (1995) e CHOI *et al.* (1998), altas concentrações do FFb podem comprometer a fertilização, pois causariam uma maturação citoplasmática

insuficiente, atribuído principalmente à presença de fatores no FFb, como o ácido linoleico e purinas (adenosina e hipoxantina), que contribuem em manter o ovócito no estado de dictióteno, principalmente por manter alto níveis de AMPc. Esses fatores são também responsáveis pela maturação citoplasmática insuficiente, o que comprometeria o desenvolvimento do ovócito (TSAFRIRI *et al.*, 1982).

A manutenção dos ovócitos em Talp-Hepes proporcionou uma taxa de blastocistos no sétimo dia semelhante ao controle (TABELA 1). Este meio possui, além de nutrientes necessários para o metabolismo dos ovócitos, uma osmolaridade dentro dos valores considerados desejáveis para o cultivo de embriões e ovócitos (260 a 305 mOsm/Kg) DUKES (1996). O Talp-hepes atende tais condições, pois a sua osmolaridade varia de 275 a 285 mOsm/Kg. Apesar de ser um líquido fisiológico, o FFb utilizado no presente estudo apresentou osmolaridade entre 334 e 346 mOsm/Kg. Esta osmolaridade elevada pode ter sido prejudicial à maturação citoplasmática, contribuindo para o atraso no aparecimento de blastocistos no sétimo dia pós-fecundação. No entanto, salientamos que a semelhança entre a taxa de clivagem e a taxa de blastocistos totais mostrou um provável efeito inibitório do FFb na retomada da meiose sobre os ovócitos, não comprometendo sua maturação e seu potencial de desenvolvimento. (TABELA 1 e 2). A qualidade desses embriões foi a mesma entre os tratamentos quando avaliados no sétimo e a partir do oitavo dia de desenvolvimento embrionário, significando que o FFb não interfere na qualidade dos blastocistos. Por outro lado, fisiologicamente a osmolaridade elevada do FFb não provoca danos aos ovócitos mantidos dentro dos folículos das fêmeas vivas. Isso se deve ao fato de conter agentes considerados osmólitos, como a taurine (DUKES, 1996), que ajuda a manter o equilíbrio osmótico intracelular. Esses agentes são transportados para dentro ou fora das

células, via canais de Na^+ , quando ocorre um estresse osmótico, mantendo assim o volume celular. Na ausência desses agentes, a célula precisaria aumentar ainda mais a troca de osmólitos inorgânicos, como K^+ e Cl^- , o que seria desvantajoso (DUMOULIN *et al.* 1997). Ao inativar o FFb, para eliminar contaminantes, como fatores de complementos, pode-se também estar eliminando fatores necessários para o total equilíbrio da osmose entre o ovócito e FFb, como também alterando outras possíveis características do fluido que poderiam fazer falta durante a manutenção dos ovócitos e provocar o desenvolvimento embrionário mais lento após a fecundação.

Tabela 1 : Efeito do fluido folicular bovino (FFb) e Talp-Hepes na manutenção do ovócito bovino imaturo avaliado pela taxa de clivagem, produção de blastocistos no 7^o dia após fecundação e produção total de blastocistos.

Tratamentos	n ¹	Clivagem n (%)	Blastoc. 7 ^o dia n (%)	Blastocisto total ² n (%)
T1-Talp-Hepes + 70% FFb	139	84 (60,43) ^a	28 (20,14) ^a	38 (27,34) ^a
T2-100% FFb	157	90 (57,32) ^a	29 (18,47) ^a	41 (26,11) ^a
T3-100% Talp-Hepes	143	82 (57,34) ^a	36 (25,17) ^{ab}	47 (32,87) ^a
Controle	92	62 (67,39) ^a	32 (34,78) ^b	34 (36,96) ^a

Valores com diferentes letras na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$)

1= Total de 4 repetições

2= Blastocisto total (soma de blastocistos no 7^o e 8^o dia após fecundação).

Tabela 2 : Efeito do fluido folicular bovino (FFb) e Talp-Hepes na manutenção de ovócito bovino imaturo avaliado pela taxa de eclosão dos blastocistos.

Tratamentos	n ¹	Blastocistos eclodidos ² n (%)
T1-Talp-Hepes + 70% FFb	29	19 (65,52) ^a
T2-100% FFb	37	26 (70,27) ^a
T3-100% Talp-Hepes	37	25 (67,57) ^a
Controle	27	18 (66,67) ^a

Os valores obtidos não foram diferentes entre os tratamentos ($p > 0,05$)

1= Total de 3 repetições

2= Blastocistos eclodidos em função do total de blastocistos mantidos e cultivados até 11^o dia após a fecundação.

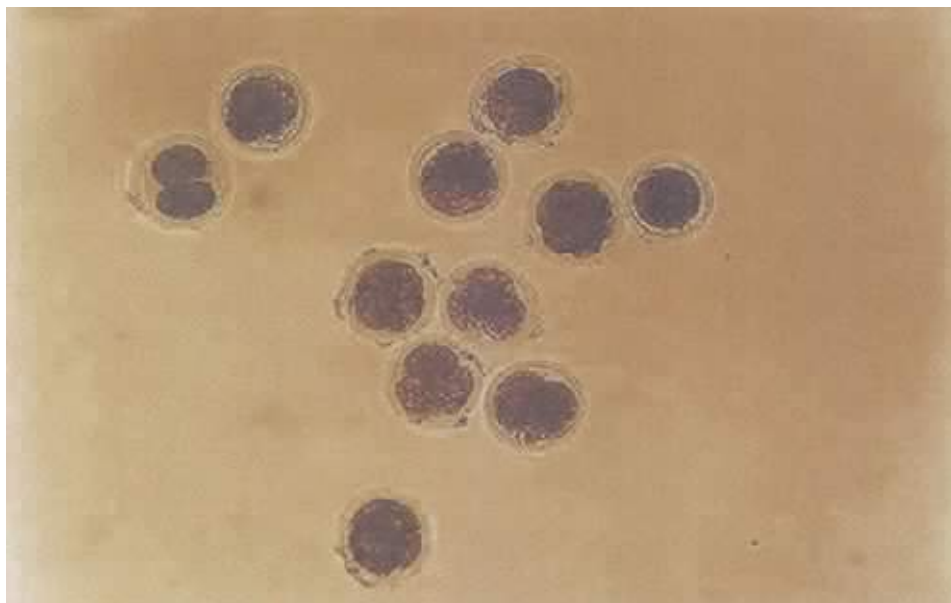


FIGURA 2: DIVISÃO CELULAR DOS ZIGOTOS BOVINOS APÓS 72 HORAS DA FIV



FIGURA 3: BLASTOCISTO EM ECLOSÃO

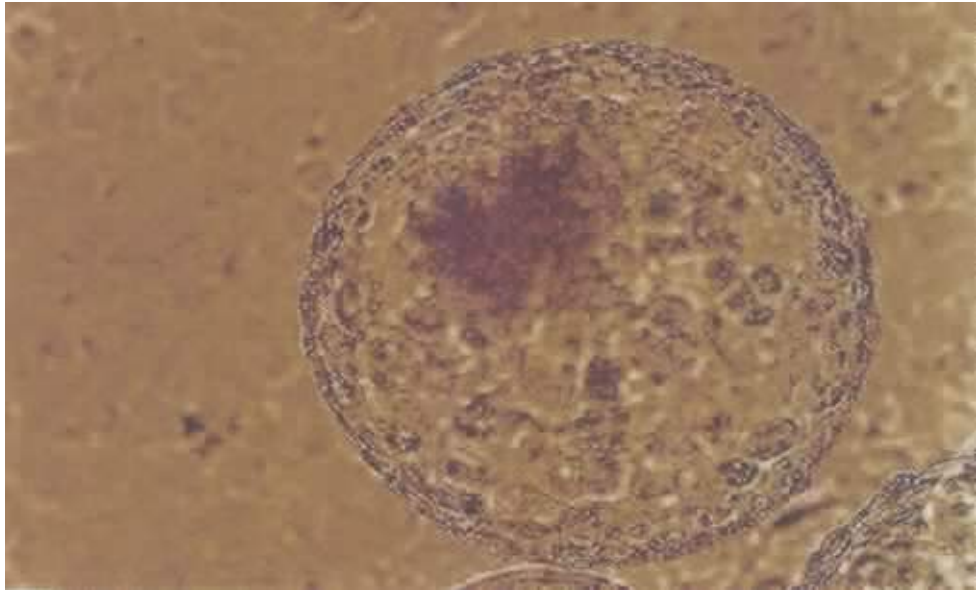


FIGURA 4: BLASTOCISTO ECLODIDO

5. CONCLUSÕES

A exposição dos ovócitos a 70% e 100% de fluido folicular (FFb) e 100% de meio Talp-Hepes por cinco horas não afetou as taxas de clivagem, blastocistos totais e blastocistos eclodidos, quando comparados ao controle (procedimento convencional). O FFb pode ser considerado uma alternativa para ser usado como meio de transporte de ovócitos ao laboratório, por um período de até 5 horas após sua coleta.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTAS, H.; WHEELER, M. B.; ROSENKRANS Jr., C. F.; FIRST, N. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Maintenance of bovine oocytes in prophase of meiosis I by High [cAMP] i. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.105, p. 227-235; 1995.
- ASSEY, R. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p. 335-344, 1994.
- AYOUB, M. A.; HUNTER, A. G. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. **Journal of Dairy Science**, v.76, p. 95-100, 1993.
- BEHRENSDORF, L. C. Fluido folicular bovino para manutenção e transporte de ovócitos imaturos. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), **UFRRJ**, 1999.

- BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; VAN DEN HURK, R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p. 13-22, 1997.
- BRACKETT, B. G. A review of bovine fertilization in vitro. **Theriogenology**, v.19, n.1, p. 1-15, 1983.
- CHAINNING C. P; EVANS V. W. Stimulatory effect of ovine prolactin upon cultured porcine granulosa cell secretion of inhibitory activity of oocyte maturation. **Endocrinology**, v.111, n. 5. p. 1746-1748, 1982.
- CHANG, M. C. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. **Journal of experimental Zoology**, v. 128, p. 378-405, 1955 In: MOOR, R. M. e WARNES, G. M. Meiosis in Mammalian oocytes. **Britsh. Med. Bull.**, v.35, n.2, p. 99-103, 1979b.
- CHOI, Y. H.; TAKAGI, M.; KAMISHITA, H.; WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; ACOSTA, T. J.; MIYAZAWA, K.; SATO, K. Development capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.50, n.1-2, p. 27-33, 1998.
- COSTA, E. P. Aspectos morfológicos, citológicos, ultra-estruturais e desenvolvimento de ovócitos bovinos *in vitro*. **Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária**, Belo Horizonte, Dissertação de Doutorado, 1994.
- CRAN, D. G. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38 (supl.), p. 49-62; 1989.
- CROSS, P. C.; BRINSTER, R. L. In vitro development of mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v.2, p. 298-307, 1970.

- DOSTAL, J.; PAVLOK, A. Isolation and characterization of maturation inhibiting compound in bovine follicular fluid. **Reproduction Nutrition Development**, v.36, n.6, p. 681-690, 1996.
- DUKES, H. H. Endocrinologia, Reprodução. **Fisiologia dos Animais Domésticos**, 11.^a Edição, p. 603-615, 1996.
- DUMOULIN, C. M; VAN WISSEN, C. P; MENHEERE, C. A.; MICHIELS, H. J. C; GERAEDTS, P. M; EVERS, L. H. Taurine Acts as an osmolyte in human and mouse oocytes and embryos. **Biology of Reproduction**, v.56, n.3, p. 739-744, 1997.
- EPPIG, J. J; DOWNS, S. M. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development in vitro: maintenance of meiotic arrest and gonadotrop induced oocyte maturation. **Development Biology**, v. 119, p. 313-321, 1987.
- EUSEBI, F.; PASSETO, N.; SIRACUSA, G. Acetylcholine receptors in human oocytes. **Biology of Reproduction**, v.28, supl 1. p. 86 (abstract), 1983.
- FAIR, T.; HYTTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte size in relationship to follicular diameter, maturational competence and RNA synthesis. **Theriogenology**, v.43, n. 1, p. 209, 1995.
- FLEMING, A. D.; WATSON, E. A. In vitro maturation of rat oocytes in defined medium and their subsequent developmental capability. **Biology of Reproduction**, v.28, supl. 1. p. 74 (abstract), 1993.
- FONSECA, V. O.; VALE, V. R; MIES, A.; ABREU, J. J. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1992.

- FRANCHIMONT, P. Un aspect nouveau de la régulation de la reproduction: les cybernines intragonadiques. **Ann. d'Endocrin**, v.43, p. 181-192, 1982.
- FRETER, R. R; SCHULTZ, R. M. Mechanism of gonadotropin regulation of mouse oocyte maturation. **J. Cell. Biology**., v.97, p. 24, 1983.
- FUKUDA, Y.; ICHIKAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. **Biology of Reproduction**, v.42, n.1, p. 114-119, 1990.
- GRIMES, R. W.; IRELAND, J. J. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.35, p. 725-732, 1986.
- GUERRA, M. O.; PETERS V. M. Ovogênese em mamíferos: aspectos fisiológicos das divisões celulares. **Ciência e Cultura**, v.42, n.1, p. 5-12, 1990.
- HUBBARD, C. J. The temporal relationship of gonadotropin and cyclic nucleotide changes to oocyte maturation in the proestrous hamster. **Biology of Reproduction**, v.28, (supl 81), abstract, 1983.
- HYTTEL, P.; CALLESSEN, H.; GREVE, T. Ultra structural features of preovulatory oocyte maturation in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.76, p. 645-656; 1986.
- HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESSEN, H. Cortical granule dynamics in cattle ova **Theriogenology**, v.31, n.1, p. 205, 1989.
- HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESSEN, H., GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**. v.47, n.1, p. 23-32, 1997.

- IRITANI, A.; KASAI, M.; NIWA, K.; SONG, H. B. Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p. 487-492, 1984.
- JAHN, C. L.; BARAN, M. M.; BACHVAROVA, R. Stability of RNA synthesized by the mouse oocyte during its major grown phase. **Journal of Experiental Zoology**, v.197, p.161-172, 1976.
- KA, H.; SAWAI, K.; WANG, W.; IM, K.; NIWA, K. Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promotor male pronuclear formation in porce oocytes matured and penetrated in vitro. **Biology of Reproduction**, v.57, n.6, p. 1478-1483, 1997.
- KIM, K. S.; MITSUMIZO, N.; FUJITA, K.; UTSUMI, K. The effects of follicular fluid on in vitro maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. **Theriogenology**, v.45, n.4, p. 787-799, 1996.
- KING, W. A.; BOUSQUET, D.; GREVE, T.; GOFF, A. K. Meiosis in bovine oocytes matured in vitro and in vivo. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.27, n.2, p. 267-279, 1986.
- LARROCA, A. C. K.; CALVO, M. J.; VIQUEIRA, A. H. Effect of follicular fluid and oestrus cow serum on in vitro production of bovine embryos. **Agro-ciencia**, v.11, n.2, p. 145-150, 1995.
- LIEBFRIED M. L.; FIRST, N. L. Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, v.23, p. 699-704, 1980. In: CHAUHAN, M. S.; PALTA, P.; DAS, S. K.; KATIYAR, P. K.; MADAN, M. L. Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in

- the MIV medium: effects of maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes in vitro. **Theriogenology**, v.48, n.3, p. 461-469, 1997.
- LIEBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRISTER, E. S.; EYESTONE, D. L.; NORTHEY, D. L.; FIRST, N. L. Development potential bovine oocytes matured in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v.36, p. 376-383, 1987.
- LIEBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRISTER, E. S.; PARRISH, J. J.; FIRST, N. L. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.31, n.1, p. 61-74, 1989.
- LIEHMAN, P.; GREVE, T.; XU, K. P. Nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes cultured with dbcAMP, FSH and HCG. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.27, n.4, p. 566-574, 1986.
- LONERGAN, P.; KHATIR, H.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 hours. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p. 355-365, 1997.
- MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GÉRARD, M.; SOLARI, A.; THIBAUT, C. In vitro culture of bovine egg fertilized either in vivo or in vitro **Reproduction Nutrition Development**, v.29, n.5, p. 559-568, 1989.
- MONOGHAN, P.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; SHARIF, H.; WAHID, H.; GORDON, I. The effect of maturation time on the subsequent in vitro development of bovine oocyte. **Theriogenology**, v.39, n.1, p. 270, 1993.
- MOOR, R. M. Role of steroids in the maturation of ovine oocytes. **Annl. Biol. Anim. Biophys.**, v.18, p. 477-482, 1978.

- MOOR, R. M; WARNES, G. M. Regulation of oocyte maturation in mammals. In *Control of Ovulation*, (D.B. Crighton, G.R. Foxcroft, N.B. Haynes and G.E. Lamming, eds.). **Butterworths**, London., p:159-176, 1979a.
- MOOR, R. M; WARNES, G. M.. Meiosis in mammalian oocytes. **British. Med. Bull.**, v.35, n.2, p:99-103, 1979b.
- MOORE, G. P. M; LINTERN-MOORE, S. A correlation between growth and RNA synthesis in the mouse oocyte. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.39, p. 163-166; 1974.
- MOTLIK, J.; FULKA, J. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. **Theriogenology**, v.25, n.1, p. 87-96, 1986.
- NORBURY C.; NURSE, O. Animal cell cycles and their control. **Annual Rev Biochem.**, v.61, p. 441-470, 1992.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. **Theriogenology**, v.24, p. 537-549, 1995.
- RACOWSKY, C. E.; McGAUGHEY, R. M. Further studies of the effects of follicular fluid and membrana granulosa cells on the spontaneous maturation of pig oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.66, p. 505-512, 1982.
- ROMERO-ARREDONDO; SEIDEL, G. E JR. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.41, n.2, p. 383-394, 1994.
- SAEKI, K.; NAGAO, Y.; UTAKE, K.; ISHIMORI, H. Maturation of bovine oocytes by co-culture with rabbit pre-ovulatory follicle cells. **Japanese Journal of Zootechnical Science**, v.61, p. 89-90; 1990

- SIRARD, M. A.; FIRST, N. L. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. **Biology of Reproduction**, v.39, p. 229-234, 1988.
- SIRARD, M. A. Temporally inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. **Biology of Reproduction**, v.39, p. 777-789, 1989.
- SIRARD, M. A.; FLORMAN, H. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; BARNES, F. L.; SIMS, M. L.; FIRST, N. L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.4: p. 1257-1263; 1989.
- SIRARD, M. A. Temporary inhibition of meiosis resumption in vitro by Adenylate Cyclase stimulation immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v.33, n.4, p. 757-767, 1990.
- SIRARD, M. A; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, v.43, p. 777-783, 1990.
- SIRARD, M. A; COENEN, K; BILODEAU, S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v.37, n.1, p. 39-55, 1992.
- SIRARD, M. A; ROY, F.; PATRICK, B.; MERMILLOD, P.; GUILBAULT, L. A. Origin of the follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. **Theriogenology**, v.44, n.1, p. 85-94, 1995.
- SORENSEM, R. A; WASSARMAN, P. M. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. **Development Biology**., v.50, p. 531-536, 1976.
- STAIGMILLER, R. B.; MOOR, R. M. Effect of follicle cells on the maturation and development competence of bovine oocytes matured outside the follicle. **Gamete Research**, v.9, p. 221-229, 1984.

- SUH, T. K.; REHMAN, N.; COLLINS, A.; WRIGHT Jr. R. W. Effects of granulose cells from different size follicles in co-culture with bovine oocytes on maturation, fertilization and cleavage. **Theriogenology**, v.39, n.1, p. 323, 1993.
- SÜSS, U.; WÜTHRICH, K. Stages of the first meiotic division observed in bovine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, v.23, n.1, p. 231 (Abstr.), 1985.
- TSAFRIRI, A; CHAINNING, C. P. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid open porcine oocytes meiosis in vitro. **Endocrinology**, v.96, p. 922-927, 1975a.
- TSAFRIRI, A; CHAINNING, C. P. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocyte in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.43, p. 149-152, 1975b. In: ROMERO-ARREDONDO; SEIDEL, G. F. JR. Effects of follicular fluid during in vitro maturation of bovine oocytes on in vitro fertilization and early embrionic development. **Biology of Reproduction**, v.55, n.5, p. 1012-2016, 1996.
- TSAFRIRI, A.; LINDER, H, R.; ZUR, V.; LAMPRECHT, S. A. In vitro induction of meiotic division in follicle- inclosed rat oocytes by LH, cyclic AMP and prostaglandin E₂. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.31, p. 39-50, 1982. In: KING, W. A.; BOUSQUET, D.; GREVE, T.; GOFF, A. K. Meiosis in bovine oocyte matured in vitro and in vivo. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.27, n.2, p. 267-279, 1986.
- WANG, S.; HOLYOAK, G. R.; LIU, Y.; BUNCH, T. D. The influence of M-199 and modified CR-2 medium on the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.47, n.3-4, p. 304 (Abstr.), 1997.

- WASSARMAN, P. M. The mammalian ovum . In E. Knobil e J. Neil (org.). **Raven press Ltd.**, Nova York, p.69-102, 1988.
- YOSHIDA, M.; ISHIGAKI, K.; PURSEL, V. G. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes mature in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p. 68-71; 1992.